

THESIS

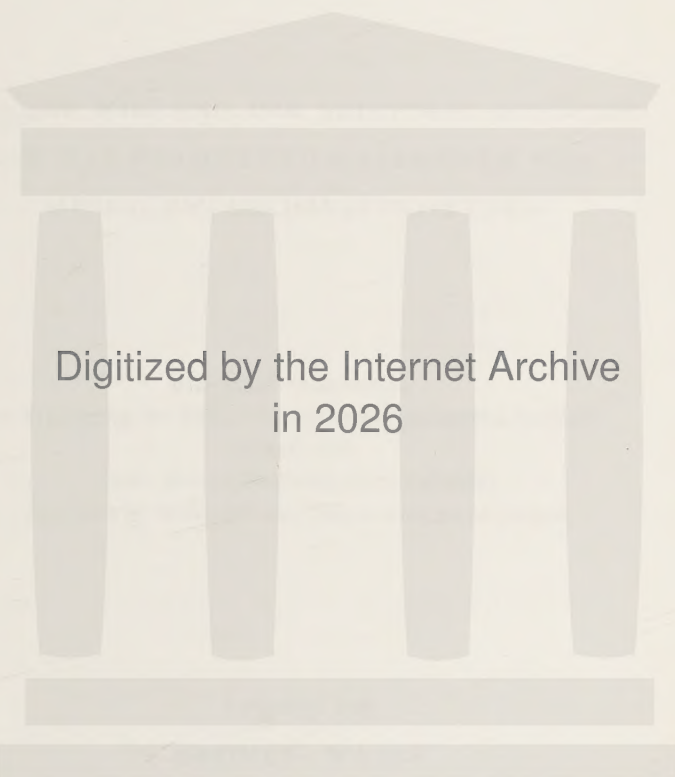
Marchen

1968

ÜBER DIE WIRKUNG DER ARISTOLOCHIASÄURE
AUF DAS PHAGOZYTÖSEVERMÖGEN VON
MEERSCHWEINCHENLEUKOZYTEN

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

HARTMUT L WAHLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153307_0176

AUS DER PÄDIATRISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. H. SPIESS

ÜBER DIE WIRKUNG DER ARISTOLOCHIASÄURE
AUF DAS PHAGOZYTLOSEVERMÖGEN VON
MEERSCHWEINCHENLEUKOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
HARTMUT WAHLE
aus München

1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. K. STEHR
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H. SPIESS
Dekan:	Prof. Dr. F. HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1968

INHALT

	Seite
EINLEITUNG	5
I. Literaturübersicht	7
II. Material und Methode	9
1. Leukozytengewinnung	9
a) Gewinnung von Meerschweinchenleukozyten	9
b) Gewinnung von Menschenleukozyten	9
2. Phagozytoseobjekte	10
3. Verwendete Präparate	10
4. Gewinnung von Normalseren	11
5. Gewinnung von Immunseren	11
6. Inkubation von Leukozyten	11
7. Inkubation von Bakterien	11
8. Versuchsanordnung der Phagozytoseversuche	12
9. Versuchsanordnung der Bakterizidieversuche	13
III. Ergebnisse	14
1. Phagozytoseversuche in Gegenwart verschieden hoher Konzentrationen der Aristolochiasäure	14
2. Phagozytoseversuche nach Inkubation der Leukozyten in Aristolochiasäure	14
3. Phagozytoseversuche nach Inkubation der Bakterien in Aristolochiasäure	15
4. Phagozytoseversuche in Gegenwart von Aristolochiasäure und Serum von Erwachsenen	15
5. Phagozytoseversuche in Gegenwart von Gamma-Globulin, Immunserum und Aristolochiasäure	16
6. Phagozytoseversuche mit verschiedenen Konzentrationen der Aristolochiasäure und Menschenleukozyten	16
7. Ergebnisse der Bakterizidieversuche	17
Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse	21
IV. Untersuchungen über die Phagozytosesteigerung durch Aristolochiasäure im Serum von Kindern	33
1. Anamnestische Angaben	34
2. Ergebnisse	34
3. Tabellarische Zusammenstellung der Versuchsergebnisse	39
V. Diskussion	47
VI. Zusammenfassung	51
Schrifttum	53

EINLEITUNG

Einer der wichtigsten Schutzmechanismen des Körpers gegenüber bakteriellen Infektionen ist die Phagozytosefunktion bestimmter Körperzellen. Phagozytierende Zellen haben die Fähigkeit, Bakterien und andere korpuskuläre Substanzen in ihr Plasma aufzunehmen und diese auch nach Vermögen ihres Fermentapparates aufzulösen. Eine Übersicht über die bisher bekannten Fermentsysteme phagozytischer Zellen ist in jüngster Zeit von ORZECOWSKI (1) und SCHMID (2) gegeben worden.

Funktionell sprechen wir von den Mikrophagen und den Makrophagen, wobei die Mikrophagen histologisch den polynucleären Leukozyten, die Makrophagen den Monozyten und Histiozyten zugeordnet werden. Die Phagozytose durch die Granulozyten ist an bestimmte Milieuvoraussetzungen gebunden. Dieses Milieu wird im wesentlichen durch Plasma-eiweiße garantiert. Diese unspezifischen humoralen Abwehrstoffe sind in den verschiedenen Globulinfraktionen des Serums enthalten, vor allem in der Gamma-Globulinfraktion und ihren Untergruppen.

Nicht von der Phagozytose zu trennen ist die Antikörperbildung. Antikörper können von höheren Organismen als Reaktion auf die Einwirkung von Antigenen gebildet werden. Sie sind Serumglobuline mit spezifischer Wirkung gegenüber dem betreffenden Antigen.

Metschnikoff gelangte im Anschluß an seine Studien über die Phagozytose zu der Auffassung, daß den Zellen der leukozytären Reihe eine bedeutende Rolle bei der Bildung von Antikörpern zukommt. Später erkannte man, daß die Phagozytose der eingedrungenen Antigene zwar eine Voraussetzung für die Antikörperbildung ist, daß aber die antikörperproduzierende Zelle aus sessilen oder mobilen Zellen des reticulo-histiozytären Systems herausdifferenziert wird. Nach heutiger Auffassung sind das die unreife Plasmazelle und vielleicht unter bestimmten Voraussetzungen auch die Lymphozyten.

Die Therapie bakterieller Infektionen kann somit zwei Wege beschreiten. Die erste Möglichkeit ist die antibakterielle Therapie mit Antibiotika, die andere, eine spezifische und unspezifische Steigerung der allgemeinen Körperabwehr.

Trotz aller Erfolge der antibiotischen Therapie sind immer wieder Krankheitsprozesse zu beobachten, bei denen eine Ausheilung durch eine spezifisch gegen den Erreger gerichtete Therapie nicht erreicht wird. Für die unzureichende Heilungstendenz solcher, meist chronisch infektiöser

Gewebsprozesse, sind mehrere Faktoren verantwortlich. Durch mangelhafte Durchblutung und Stoffwechselstörungen im Bindegewebe wird die lokale Gewebsresistenz herabgesetzt. Die in diesen Gewebsbezirken liegenden Keime sind meist für die humorale wie auch für die zelluläre Abwehr schlecht zugänglich. Darüberhinaus können die Keime, die eine chronische Infektion unterhalten, antibiotikaresistent geworden sein.

Diese Feststellung führte einmal zu einer intensiven Entwicklung neuer Antibiotika und andererseits zur Suche nach Substanzen, mit denen die unspezifische Körperabwehr angeregt werden kann.

Die industrielle Gewinnung der Aristolochiasäure und die damit erzielten therapeutischen Erfolge bei meist chronischen Infektionen (3) veranlassten zu untersuchen, welche Wirkung die Aristolochiasäure auf die Phagozytoseleistung polymorphkerniger Leukozyten erkennen läßt.

Es wurde daher in den nachstehend beschriebenen Versuchen die Wirkung der Aristolochiasäure auf die Phagozytoseleistung von Leukozyten im *in vitro* und im kombinierten *in vivo* - *in vitro* Experiment untersucht.

I. LITERATURÜBERSICHT ZUR ARISTOLOCHIASÄURE

Aristolochiasäure (AS) ist der Extrakt aus *Aristolochia clematitis*, einer in mitteleuropäischen Breiten vorkommenden Pflanze.

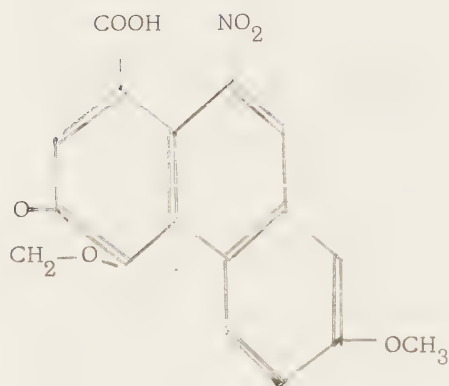
Sie ist bis zu 70 cm hoch und findet sich häufig an Hecken, Zäunen und Weinbergen mit ihren großen, runden gelblich leuchtenden Blüten.

Der Name leitet sich von *aristos* (griechisch: sehr gut) und *lochos* (griechisch: die Geburt) ab. Die Herkunft des deutschen Namens 'Osterluzei' oder auch 'Wolfskraut' läßt sich nicht mit Sicherheit erklären (4).

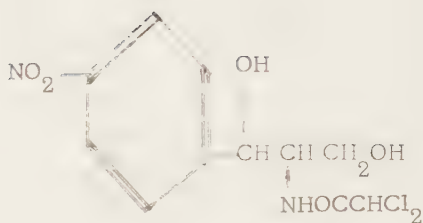
Erwähnenswert erscheint die frühere Bedeutung der Osterluzei als Heilmittel. Schon Hippokrates hat sie gegen Brustfellentzündungen empfohlen (4). Im 10. Jahrhundert bezeichnete die medizinisch gebildete Äbtissin Hildegard von Bingen die Extrakte aus Osterluzei als uterusreinigendes Mittel (5).

Später glaubte Paracelsus mit dieser Pflanze ein Heilmittel gegen den Krebs gefunden zu haben (6). Lonicerus, Matthiolus und von Haller erwähnen die Heilkraft der Osterluzei, ohne eine besondere Indikation anzugeben (7). In jüngerer Zeit wurde mehrfach über eine erfolgreiche Therapie mit AS bei chronischen Geschwüren, Eiterungen und Tonsillitiden berichtet (MÖSE (8), MOSER (3), ORZECOWSKI (9), BAETGEN (10), JUMMEL (11), v. PHILIPSBORN (17)).

Die chemische Aufklärung und Darstellung der wirksamen Substanz gelang einer Forschergruppe der Dr. Madaus Werke Köln/Rhein (11). Es handelt sich um ein Gemisch von Dinitrophenantrencarbonsäuren (3,4-Methylendioxy-8-methoxy-10-nitrophenanthrencarbonsäure-1.), die als Aristolochiasäure A, B und C bezeichnet werden. Die Säuren unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer 8-Methoxy-Gruppe bei Säure A, sowie dem Fehlen dieser Gruppe bei Säure B. Säure C enthält wahrscheinlich mehr als eine Methoxy-Gruppe.



Aristolochiasäure



Chloramphenicol

Auffallend ist die Nitro-Gruppe, die auch im Antibioticum Chloramphenicol enthalten ist. Die anfangs gehegte Hoffnung, mit Aristolochiasäure ein pflanzliches Antibiotikum gefunden zu haben, ließ sich jedoch nicht bestätigen (12).

Die physikalischen Daten zeigen eine Unlöslichkeit der Aristolochiasäure in Kohlenwasserstoffen, geringe Löslichkeit in Wasser, aber beste Löslichkeit in Dioxan. Der Schmelzpunkt der aus Methanol kristallisierten, im Exsiccator getrockneten Säure liegt bei 275°C . Die Farbe der gelösten Substanz ist intensiv gelb, bei AS C mehr rot. Die geruchlose Säure ist von stark bitterem Geschmack (12).

II. MATERIAL UND METHODE

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden im wesentlichen nach einer von STEHR (13) angegebenen Methode durchgeführt.

1) Leukozytengewinnung

a) Gewinnung von Meerschweinchenleukozyten

Zur Leukozytengewinnung wurde 12 Stunden vor Versuchsbeginn einem nüchternen ca. 250 g schweren Meerschweinchen 15 ml einer sterilen, eiskühlten Peptonlösung (Pepton e carne trypticum 25,0 Kochsalz 5,0 mit Aqua dest. ab 1000,0) intraperitoneal injiziert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn, etwa 8-10 Stunden nach der Injektion, erfolgte die Eröffnung des Peritonealraumes, nachdem das Versuchstier durch Nackenschlag getötet worden war, um das leukozytenreiche Exsudat abzupipettieren. Nach darauffolgendem Ausspülen des Peritonealraumes mit auf 37°C erwärmter physiologischer Kochsalzlösung ließen sich durch vorsichtiges Zentrifugieren bei niedrigen Umdrehungszahlen (weniger als 1000 U/min) die Zellen im Sediment anreichern.

Das Aufschwimmen der Leukozyten erfolgte mit auf 37°C angewärmter physiologischer Kochsalzlösung in stets gleicher Dichte.

b) Gewinnung von menschlichen Leukozyten

Zur Blutentnahme wurde eine Rekordspritze (10 ml) mit wenig Heparin benetzt. Das somit ungerinnbare Blut wird langsam in sterile Glasohre gegeben, die am unteren Ende mit einem Stopfen versehen waren. Diese hatten eine Länge von 60 cm bei einer lichten Weite von 5 mm.

Diese Glasrohre werden schräg in einem Winkel von 45° aufgestellt. Es bildet sich nach 4 Stunden an der Trennwand zwischen roten Blutkörperchen und Serum eine weiße Wolke von Leukozyten, die mit Mikropipetten abgesaugt, dann zentrifugiert und in vorgewärmter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurden.

Die im Versuch verwendete Leukozytensuspension entstand durch Aufschwimmen des Sedimentes in physiologischer Kochsalzlösung (37°C).

2) Phagozytoseobjekte

Als Phagozytoseobjekte dienten 20stündige Kulturen von Enteritis-Coli-Bakterien des Typs O111 sowie ein Stamm von Streptokokkus faecalis (Enterokokken).

Enteritis-Coli wurden in Schrägagarkulturen für jeden Versuch gezüchtet. Das Nährsubstrat für Enteritis-Coli hatte folgende Zusammensetzung:

Pepton e carne trypticum (Merck)	25,0
NaCl (Merck)	5,0
DIFCO-BACTO-Agar	25,0
aufgefüllt mit Aqua dest. ad	1000,0

Nach Aufkochen der Suspension entstand eine klare Lösung, die mit Hilfe von Natronlauge auf ein pH von 7,4 eingestellt wurde.

Nach Autoklavieren bei 134° C von 1 Minute Dauer erfolgte die Sterilitätsprobe der fertigen Agarröhrchen durch 24stündiges Bebrüten bei 37° C. Das Überimpfen der fortlaufend gezüchteten Bakterienkulturen erfolgte mindestens einmal wöchentlich, wobei gleichzeitig eine mikroskopische und kulturelle Prüfung auf Reinheit durchgeführt wurde.

Durch Aufschwemmen einer 20stündigen Bakterien-schrägagarkultur in 5 ml auf 37° C vorgewärmter steriler physiologischer Kochsalzlösung entstand die für den Versuch benötigte Bakteriensuspension.

Die Züchtung der Enterokokken (Streptokokkus faecalis) erfolgte auf Blutagar, der folgende Zusammensetzung hatte:

900 ml Peptonagar (Herstellung wie oben) wurde bei einer Temperatur von 50° C mit 80 bis 100 ml defibriniertem Schafsblood, das auf 45° C vorgewärmt worden war, versetzt und in Petrischalen ausgegossen. Diese Platten wurden ebenfalls durch 24stündiges Bebrüten bei 37° C auf Sterilität geprüft.

3) Verwendete Präparate

Bei der in den Versuchen verwendeten AS handelte es sich um eine 1%ige wässrige Lösung.

Die handelsüblichen Gamma-Globulin-Präparate stellten eine 16%ige sterile Lösung dar. Diese Präparate enthielten im wesentlichen elektrophoretisch reines Gamma-G-Globulin.

4) Gewinnung von Normalserum

Neben Normalserum von Erwachsenen wurde auch Meerschweinchen Serum verwendet. Es wurde durch Herzpunktion gewonnen.

5) Gewinnung von Immunserum

Kaninchen-Immunserum, das wegen seiner optimalen Phagozytoseaktivität in einigen Versuchen zum Vergleich diente, wurde nach folgendem Verfahren hergestellt:

Junge, 2000 bis 2500 g schwere Kaninchen wurden mit O-Antigenhaltigem Impfstoff aus *E. coli* des Typs O111 in 5tägigen Abständen und ansteigenden Dosen von 0,5 bis 2,0 ml durch intravasale Injektion immunisiert. Um eine ausreichende Antikörperkonzentration mit einer Mindestagglutination von 1 : 1024 zu erreichen, war es notwendig, die letzte Impfdosis von 2 ml mehrmals zu verabreichen.

Als Impfstoff diente eine 20stündige Kultur des *E. coli*-Stammes vom Typ O111, die in 5,0 ml physiologischer Kochsalzlösung (37° C) aufgeschwemmt worden war. Die Sterilisierung mit Zerstörung der H-Antigene erfolgte durch 2stündiges Erhitzen bei 100° C im Dampftopf.

6) Inkubation von Leukozyten

Zum Aufschwemmen der frisch gewonnenen Meerschweinchenleukozyten diente in diesen Versuchen eine 0,1 %ige Lösung der AS anstatt physiologischer Kochsalzlösung. Diese Suspension blieb während 10, 20 bzw. 30 min im Brutschrank. Das Zentrifugieren, Auswaschen und Aufschwemmen der inkubierten Leukozyten, wie auch einer zur Kontrolle mitgeführten Leukozytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung erfolgte nach der angegebenen Zeit. Eine Inkubation in 1 %iger AS gelang nicht. Beim Zentrifugieren verformte sich die 1 %ige AS-Leukozytensuspension zu einer gelatinösen Masse.

7) Inkubation von Bakterien

Eine frisch vom Bakterienrasen gewonnene Suspension von *E. coli* bzw. Enterokokken wurde zentrifugiert, das Sediment in 0,1 %iger AS aufgeschwemmt. Nach 15, 30 und 45 min langer Aufbewahrung bei 37° C im Brutschrank wurden die Bakterien wieder abzentrifugiert und nach Aus-

waschen und Wiederaufschwimmen in physiologischer Kochsalzlösung dem Phagozytoseversuch zugeführt.

8) Versuchsanordnung der Phagozytoseversuche

Sterile, vorgewärmte Reagenzgläser wurden mit 0,1 ml AS in den Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} beschickt. Andere Versuchsreihen enthielten statt AS die gleiche Menge an Normalserum vom Erwachsenen, Kaninchen-Immunsrum, Gamma-Globulin bzw. Meer-schweinchensrum. Zu den 0,1 ml der zu untersuchenden Substanz kamen 0,2 ml Leukozytensuspension und 0,1 ml Bakteriensuspension von gleichbleibender Dichte hinzu.

Als Kontrollansatz für minimale Phagozytose diente ein Gemisch von Bakterien und Leukozyten in physiologischer Kochsalzlösung. Die Bestimmung des optimalen Phagozytosegrades erfolgte mit konzentriertem Kaninchen-Immunsrum, dessen starke phagozytosesteigernde Wirkung bekannt war. Nachdem der stark phagozytosesteigernde Effekt der AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ bekannt war, diente dieser Wert ebenfalls als Kontrollwert. Durch Ermittlung dieser Standardwerte war die Beurteilung des Phagozytosegrades mit ausreichender Genauigkeit gewährleistet.

Von jedem Versuchsansatz wurde nach gutem Durchmischen ein Sofortpräparat durch Ausstrich der Suspension mit einer Platinöse auf fettfreiem Objektträger angefertigt. Nach 15, 30, 60 und 90 Minuten erfolgten weitere Ausstriche, die lufttrocken in einem gleichteiligen Gemisch von Äther-Alkohol fixiert und mit Löfflers-Methylenblau 20 sec lang gefärbt wurden. Das mikroskopische Auswerten der Präparate berücksichtigte neben der Zahl der phagozytierenden Zellen vor allem die Anzahl der phagozytierten Bakterien, wobei nach folgendem Schlüssel 5 Phagozytosegrade unterschieden wurden:

0 = Keine Phagozytose

1 = Vereinzelt Phagozytose (30 % der Leukozyten enthält bis 2 Bakterien)

2 = Minimale Phagozytose (30-50 % der Leukozyten enthalten 2 - 4 Bakterien)

3 = Mäßige Phagozytose (50 % der Leukozyten enthalten 4-6 Bakterien)

4 = Starke Phagozytose (50 % der Leukozyten enthalten bis 8 Bakterien)

5 = Sehr starke Phagozytose (70 % der Leukozyten enthalten mehr als 10 Bakterien)

9) Versuchsanordnung der Bakterizidieversuche

Aus den vorangegangenen Versuchen ergab sich die Frage, ob AS einen bakteriostatischen oder bakteriziden Einfluß auf die verwendeten Bakterien hat.

In den durchgeführten Bakterizidieversuchen wirkte AS in den Konzentrationen von 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % bis zu 40 Stunden lang bei Brutschranktemperatur auf die Bakterien ein. Das lange Bebrüten erforderte einen Nahrungszusatz von Peptonbouillon zu den Versuchsansätzen.

Die Versuchsansätze wurden nach der angegebenen Zeit mit auf 45⁰ C warmgehaltenem Peptonagar bzw. Frischblutagar in einer Petrischale vermischt. Anschließend verblieben die Gußplatten 20 Stunden lang im Brutschrank. Aus den Abbildungen A und B ist die Zusammensetzung der Versuchsansätze ersichtlich. Der Kontrollversuch enthielt 0,1 ml Bakterien-suspension und 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung. Die Serienkontrolle noch zusätzlich 0,1 ml Peptonbouillon, dafür nur 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung. Die Serien A bis D enthielten die AS in den verschiedenen Konzentrationen in einer Menge von 0,1 ml, zusätzlich noch 0,1 ml Bakteriensuspension und 0,1 ml Peptonbouillon,

III. ERGEBNISSE

1) Phagozytoseversuche in Gegenwart verschieden hoher Konzentrationen der AS

Wie die Abb. 1 erkennen läßt, hebt der Zusatz von 0,1 ml AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ die Phagozytoseaktivität gegenüber der Kochsalzkontrolle von Phagozytosegrad 1 (vereinzelte) auf Phagozytosegrad 4 (stark) an.

Diese Steigerung wird bei einer Konzentration der AS von $2,5 \cdot 10^{-5}$ noch deutlicher durch den Phagozytosegrad 5 (sehr stark) übertroffen.

Mit zunehmender Verdünnung der AS nimmt die phagozytosesteigernde Wirkung ab, um bei einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-8}$ den Wert der Kochsalzkontrolle zu erreichen. Die in Abb. 2 dargestellten Versuche mit Enterokokken zeigen gleichlautende Ergebnisse.

Zur Sicherung der Ergebnisse wurden die Versuche mit Leukozyten verschiedener Meerschweinchen mindestens einmal wiederholt.

Die Konzentration der AS von $2,5 \cdot 10^{-5}$ im Versuchsansatz erwies sich konstant in allen Versuchen als sehr wirksam.

2) Phagozytoseversuche nach Inkubation der Leukozyten in AS

Aus den vorangegangenen Versuchen ergab sich die Frage, ob die AS auf die Leukozyten oder auf die Bakterien verändernd einwirkt.

Die in Abb. 5 und 6 wiedergegebenen Versuche zeigen die Phagozytoseaktivität von Meerschweinchenleukozyten gegenüber *E. coli* und Enterokokken nach Inkubation in 0,1 %iger AS. Nach 10 und 20 Minuten dauernder Inkubation war gegenüber der Kochsalzkontrolle eine Steigerung der Phagozytose von Grad 1 (vereinzelte) auf Grad 4 (stark) festzustellen.

Ein Versuchsansatz mit nicht inkubierten Leukozyten erreichte in Anwesenheit von AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ ebenfalls Phagozytosegrad 4 (stark). Dagegen zeigen die Meerschweinchenleukozyten nach 30 Minuten dauernder Inkubation nur eine minimale Phagozytose. Der Versuchsansatz, dem Leukozyten, die 10 Minuten in 0,01 %iger AS inkubiert worden waren, beigegeben wurde, zeigte nur Phagozytosegrad 1 (vereinzelte).

3) Phagozytoseversuche nach Inkubation der Bakterien in AS

Wie die Abb. 7 und 8 erkennen lassen, zeigen die Versuchsansätze mit 15, 30 und 45 Minuten lang inkubierte Bakterien in 0,1 %iger AS keine Veränderung des Phagozytosegrades im Vergleich zur Kochsalzkontrolle. Der in der gleichen Versuchsreihe mitgeführte Ansatz mit frischem Meerschweinchenserum und nicht inkubierten Bakterien ergab eine starke Phagozytose. Ebenfalls eine starke Phagozytose wurde bei dem Versuchsansatz mit frischem Meerschweinchenserum und inkubierten Bakterien festgestellt. Die Versuche mit *E. coli* und Enterokokken sind im Ergebnis übereinstimmend.

4) Phagozytoseversuche in Gegenwart von AS und Serum von Erwachsenen

In den in Abb. 9, 10, 11 und 12 wiedergegebenen Versuchen wurde der Einfluß von AS in Gegenwart von Erwachsenenserum auf die Phagozytoseaktivität untersucht, um festzustellen, in wieweit eine gegenseitige Beeinflussung nachweisbar wird.

In den Versuchsansätzen war neben einer Kochsalzkontrolle auch eine Kontrolle mit dem im Versuch verwendeten Serum vorhanden. Die anderen Versuchsansätze enthielten Serum und AS in den Konzentrationen von $2,5 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$, $2,5 \cdot 10^{-6}$ und $2,5 \cdot 10^{-7}$.

Aus der Abb. 9 ist zu ersehen, daß sowohl die Versuchsansätze mit physiologischer Kochsalzlösung wie auch die Kontrolle mit Erwachsenenserum gegenüber *E. coli* nur den Phagozytosegrad 1 (vereinzelt) erreichen. Die Versuchsansätze, denen AS in den Konzentrationen von $2,5 \cdot 10^{-4}$ und $2,5 \cdot 10^{-5}$ zum Serum beigegeben war, zeigen im Gegensatz dazu eine um 3 Grad stärkere Phagozytose, während der Ansatz mit AS der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-7}$, wie bereits früher nachgewiesen, keine Veränderung im Vergleich zur Kochsalz- und Serumkontrolle erkennen ließ.

Versuche in gleicher Anordnung mit Enterokokken als Phagozytoseobjekt brachten, mit Ausnahme des Versuchsansatzes, der AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ enthielt, gleichlautende Ergebnisse. Hier trat die Anhebung der Phagozytose nur um einen Grad ein. Abb. 11 und 12 geben gleiche Versuchsreihen mit Meerschweinchenleukozyten von anderen Tieren wieder. Es wurden gleichlautende Ergebnisse erzielt.

b) Phagozytoseversuche in Gegenwart von Immunsérum, Gammaglobulin und AS

In einer kürzlich erschienenen Inaugural-Dissertation über die Phagozytoseaktivität von Meerschweinchenleukozyten in Gegenwart von Gamma-Globulinen konnte DECHAMPS (18) nachweisen, daß handelsübliches Gamma-Globulin keinen phagozytosesteigernden Einfluß ausübt. So war es von Interesse, die phagozytosefördernde Wirkung der AS in Gegenwart verschiedener handelsüblicher Gamma-Globuline zu untersuchen.

In den Abb. 13 und 14 werden die Versuchsergebnisse bei Verwendung von *E. coli* und Enterokokken wiedergegeben. Es ergab sich beim Versuchsanatz, der Gamma-Globulin österreichischer Provenienz enthält, gegenüber der Kochsalzkontrolle keine Phagozytoseanhebung. Gamma-Globulin deutscher Herkunft im Ansatz erreichte ebenfalls nur Phagozytosegrad 2 (minimal).

Versuchsanätze, die Kaninchenimmunsérum und AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ enthielten, zeigten Phagozytosegrad 4 (stark).

In der Abb. 15 sind die Ergebnisse der Untersuchungsreihe über die phagozytosesteigernde Wirkung einer Mischung von Gamma-Globulinen mit AS wiedergegeben. Durch Zugabe von AS in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ und $2,5 \cdot 10^{-5}$ konnte Phagozytosegrad 5 (sehr stark) gemessen werden, während bei einer Konzentration der AS von $2,5 \cdot 10^{-6}$ gegenüber der Kochsalzkontrolle keine Steigerung festgestellt werden konnte. Abb. 16 gibt dieselben Versuche mit Enterokokken als Phagozytoseobjekt wieder.

c) Phagozytoseversuche mit Menschenleukozyten in Gegenwart der AS in verschiedenen Konzentrationen

Den Abschluß der Untersuchungen bildet eine Versuchsreihe, bei der Menschenleukozyten anstatt Meerschweinchenleukozyten verwendet wurden. Nach früheren Untersuchungen (14) war zu erwarten, daß sich die Menschenleukozyten ähnlich wie die Meerschweinchenleukozyten verhalten. So zeigt die Abb. 17 die Versuche mit *E. coli* und Menschenleukozyten unter Zusatz von AS in verschiedenen Konzentrationen.

Gegenüber der Kochsalzkontrolle mit Phagozytosegrad 2 (minimal) hebt der Zusatz von AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ die Phagozytose auf Grad 5 (sehr stark), die Zugabe von AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ die Phagozytose auf Grad 4 (stark) an. Im Versuchsanatz mit AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-6}$ wird der Kontrollwert mit einem Phagozytosegrad 2 (minimal) erreicht.

Die Versuche mit Enterokokken zeigten die gleichen Ergebnisse. Hier hebt, wie Abb. 18 zeigt, die Zugabe von AS in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ die Phagozytose auf Grad 4 (stark) an, während bei Zugabe von AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ der Phagozytosegrad 5 (sehr stark) erreicht wird. Mit AS in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-6}$ wird nur noch eine minimale Steigerung gegenüber der Kochsalzkontrolle erreicht. Diese Ergebnisse wurden durch die Versuchsreihen der Abb. 19 und 20 bestätigt.

Faßt man die in den einzelnen Versuchsgruppen gewonnenen Ergebnisse zusammen, so läßt sich folgendes feststellen:

In der Mehrzahl der Versuchsgruppen war die Phagozytoseaktivität in Gegenwart von physiologischer Kochsalzlösung minimal.

In Abhängigkeit von der Versuchsdauer war eine ansteigende Tendenz in der Phagozytoseaktivität zu erkennen. So konnte darauf verzichtet werden, die im Sofortausstrich, nach 15, 30 und 60 Minuten gewonnenen Ergebnisse gesondert darzustellen, da sich nach 90 Minuten Versuchsdauer das unterschiedliche Phagozytoseverhalten besonders deutlich erkennen ließ.

7) Ergebnisse der Bakterizidieversuche mit Enteritis-Coli und Enterokokken

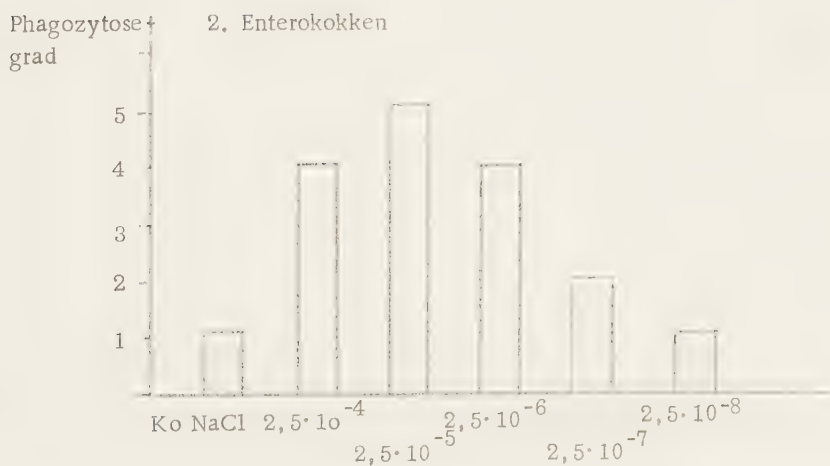
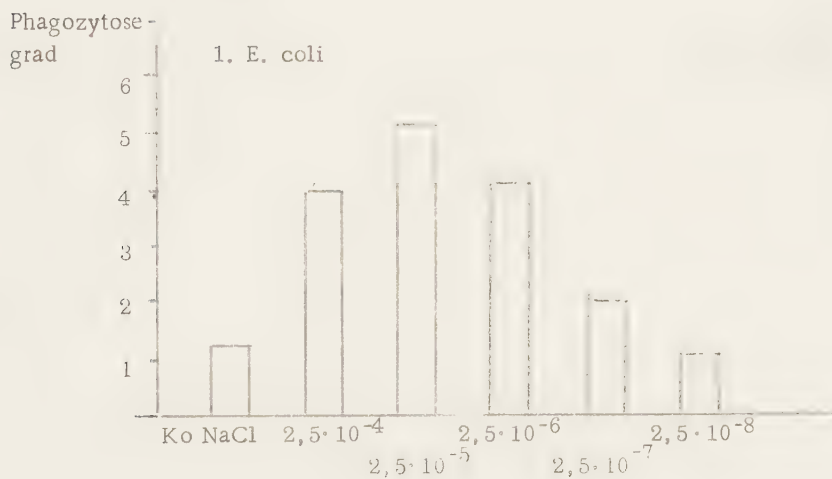
Die Tabelle A gibt die Ergebnisse der Untersuchungen über die bakterizide oder bakteriostatische Wirkung von AS auf Enteritis-Coli wieder.

Es ist daraus zu ersehen, daß bei gleichbleibender Bakterieneinsaat in jedem Versuchsansatz nach bestimmter Bebrütungszeit unendliches Wachstum beobachtet wurde. Die zunächst durchgeführten Versuche, bei denen 1 %ige, 0,1 %ige, 0,01 %ige und 0,001 %ige AS in Abständen von 1 Stunde bis zu 5 Stunden lang auf die Bakterien einwirkte, ergab keine Wachstumshemmung der Bakterien. Es lag daher nahe, die Untersuchungen nur noch mit der stärksten Konzentration der AS fortzuführen. Dabei bewirkte eine Einwirkungsdauer von 20, 30 bzw. 40 Stunden keine Veränderung im Wachstum der Bakterien.

Tabelle B gibt die Untersuchungen mit Enterokokken wieder. Auch hier konnte bei gleicher Versuchsanordnung durch AS keine Hemmung des Bakterienwachstums beobachtet werden.

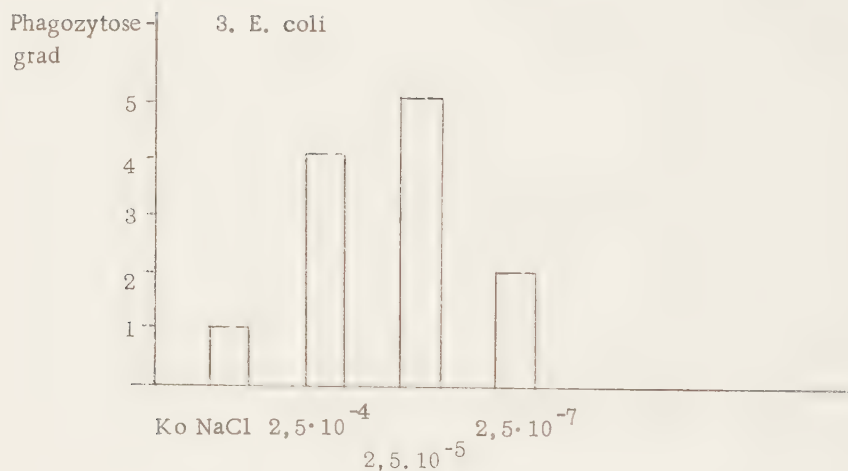
TABELLARISCHE ZUSAMMENSTELLUNG
DER VERSUCHSERGEBNISSE

Phagozytoseaktivität von Meerschweinchenleukozyten gegenüber *E. coli* und Enterokokken in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Aristolochiasäure.



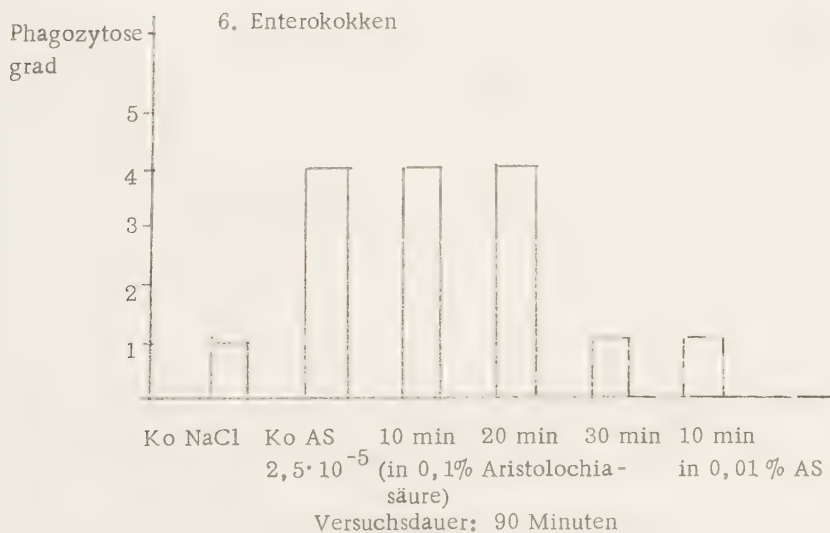
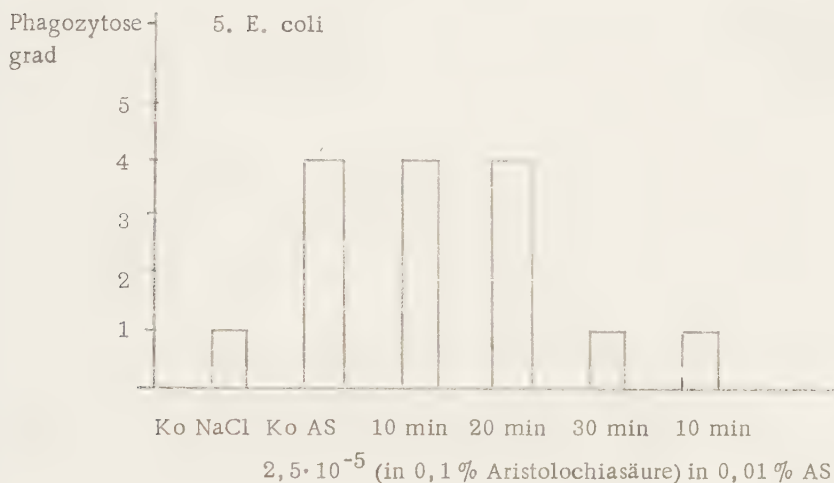
Versuchsdauer: 90 Minuten

Wiederholung der Versuchsreihe 1 und 2

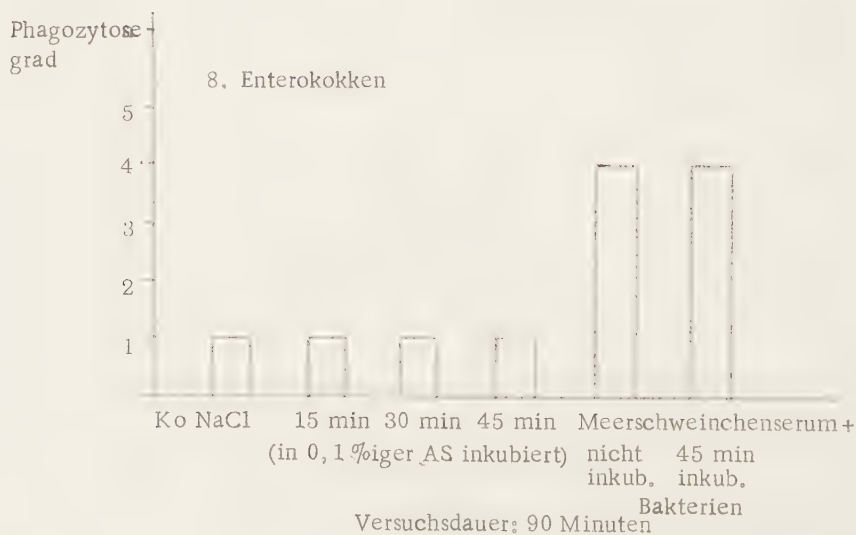
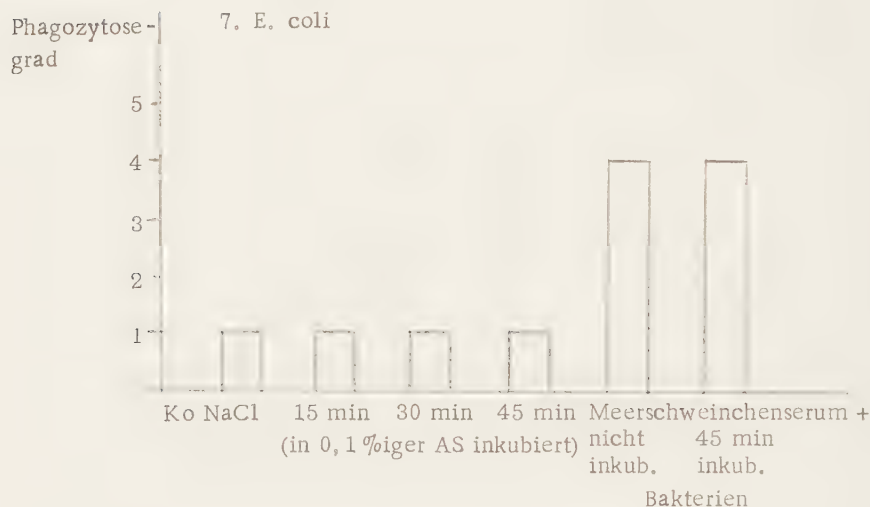


Versuchsdauer: 90 Minuten

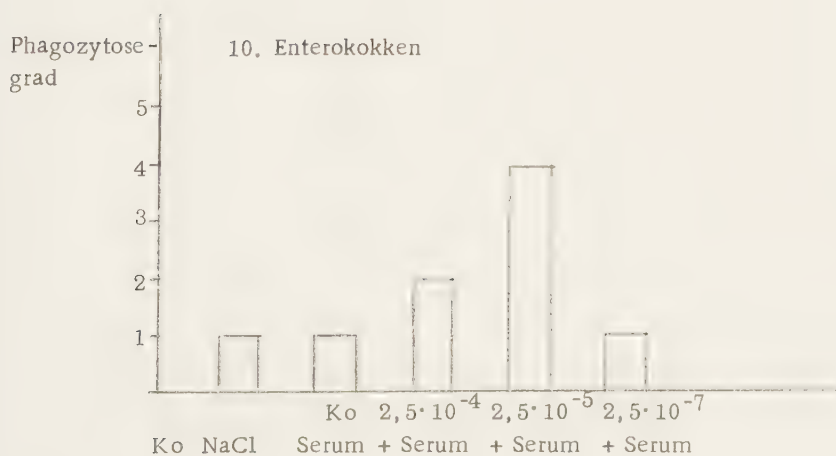
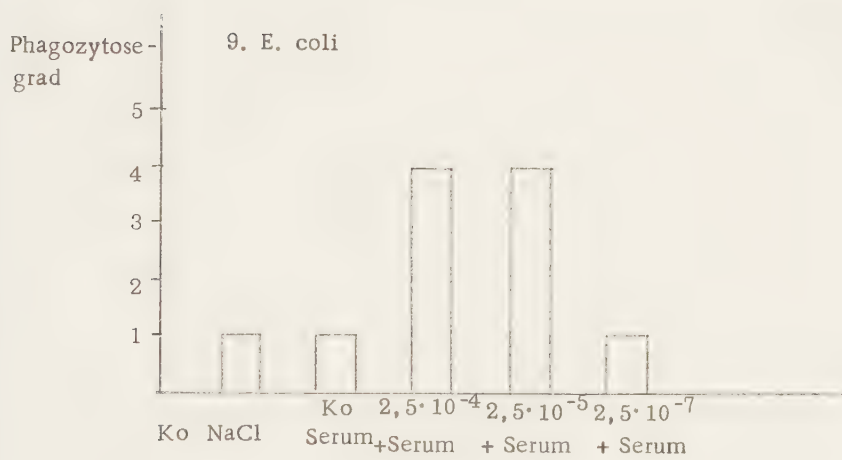
Phagozytosesteigerung von Meerschweinchenleukozyten
gegenüber E. coli und Enterokokken nach verschieden langer
Inkubation in 0,1 %iger Aristolochiasäure



Phagozytoseaktivität von Meerschweinchenleukozyten verschieden lang in 0,1 %iger AS inkubierten Bakterien. Zur Kontrolle wird frisches Komplement verwendet.

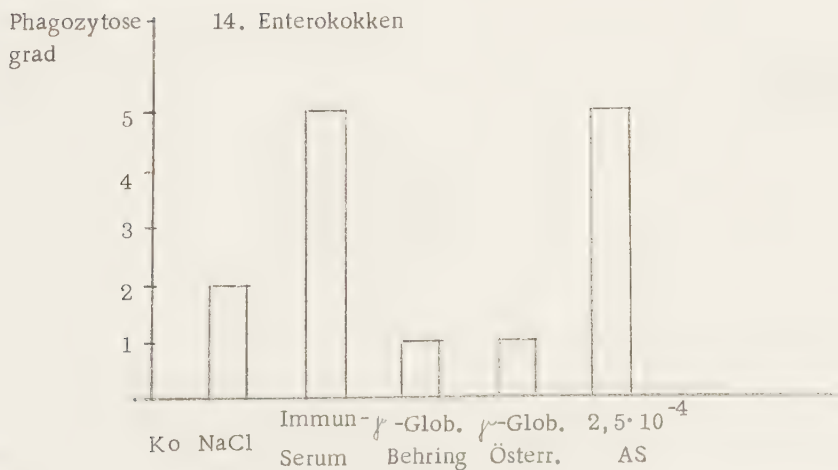
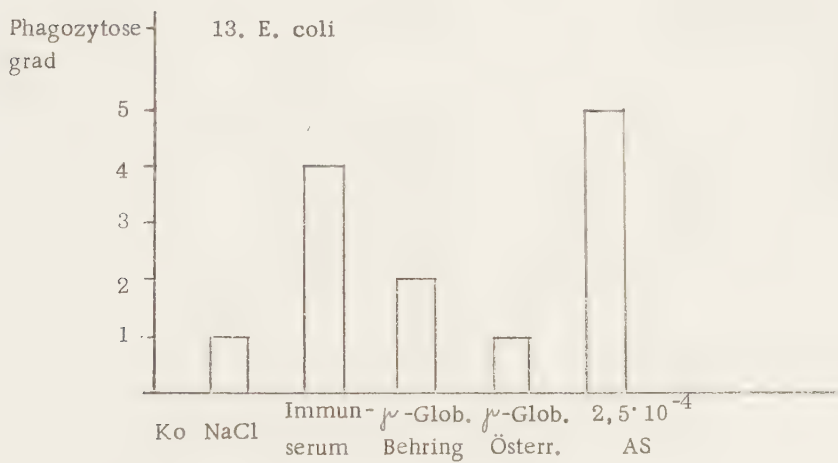


Phagozytoseaktivität von Meerschweinchenleukozyten gegen-
über *E. coli* und Enterokokken in Anwesenheit von Menschen-
serum und verschiedener Konzentration der AS



Versuchsdauer: 90 Minuten

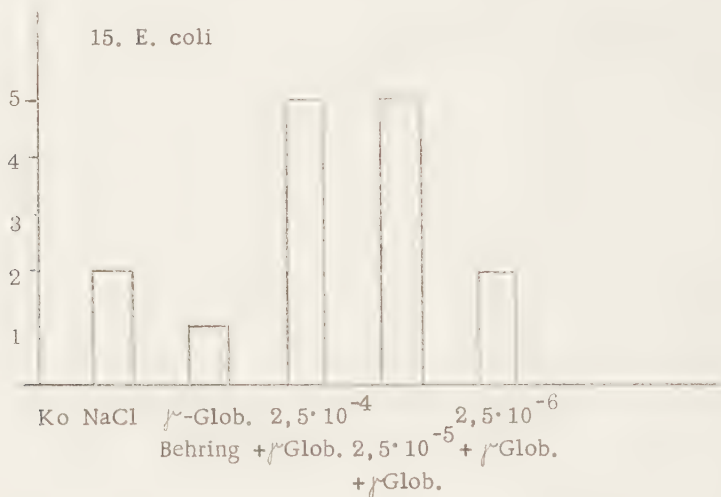
Phagozytoseaktivität von Meerschweinchenleukozyten gegenüber
E. coli und Enterokokken unter Einwirkung von Gamma-Globu-
 lin, AS und Immunserum im Vergleich



Versuchsdauer: 90 Minuten

Phagozytoseaktivität von Meerschweinchenleukozyten gegen-
über E. coli und Enterokokken in Anwesenheit von Gamma-
Glob. (Behring) und AS in verschiedenen Konzentrationen

Phagozytose-
grad

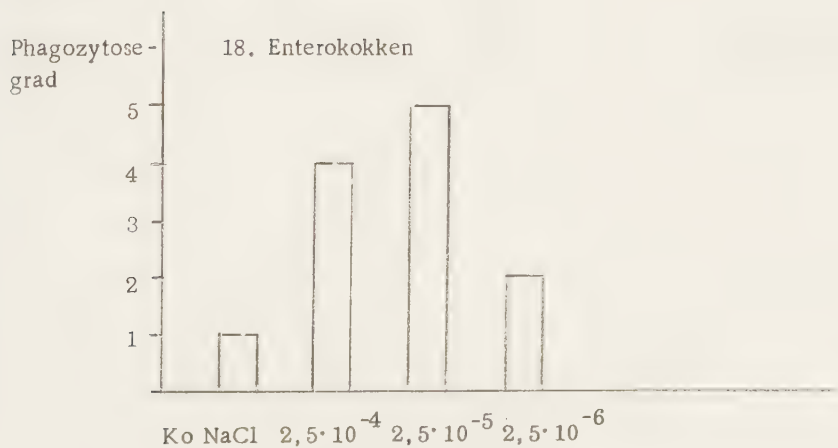
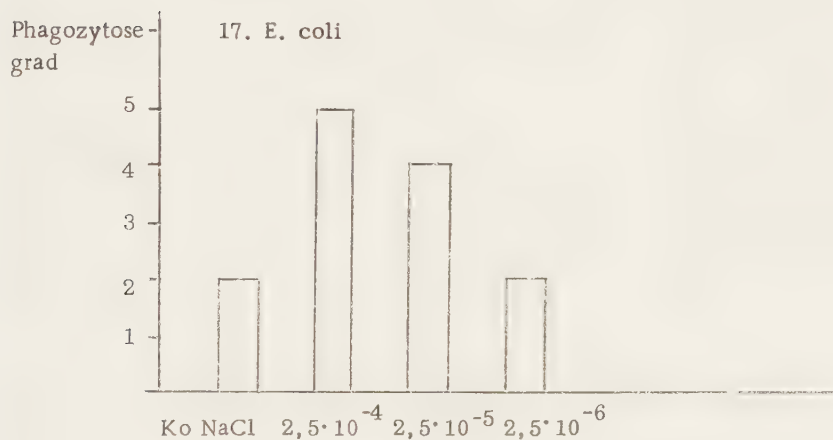


Phagozytose-
grad



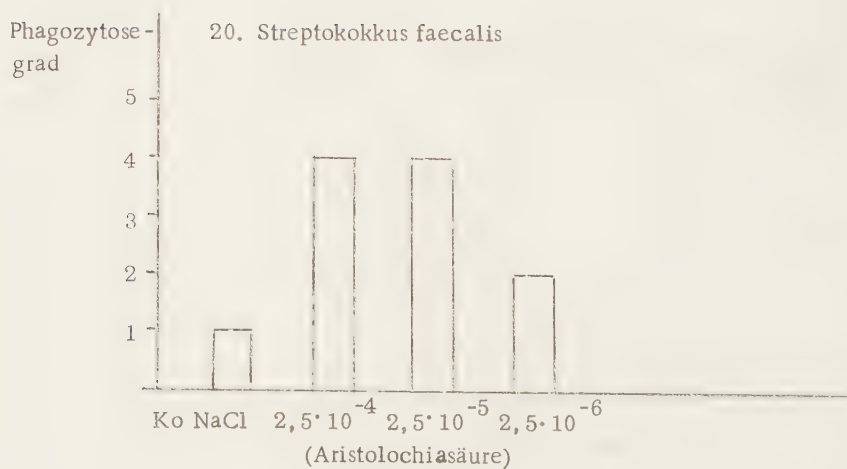
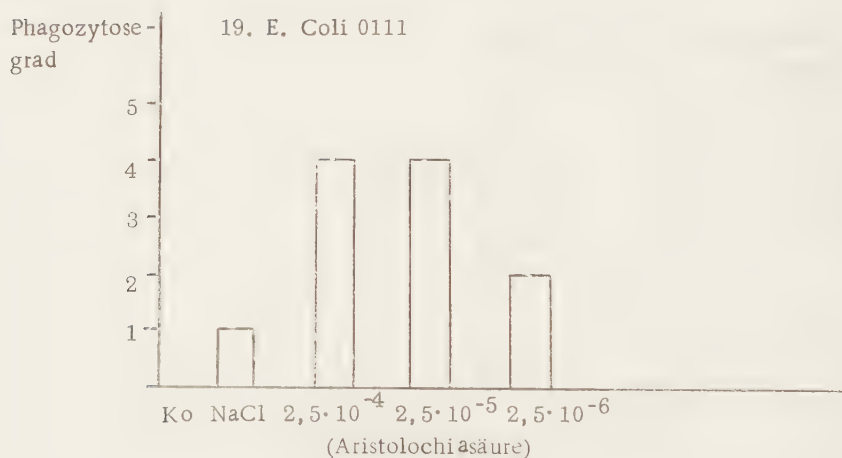
Versuchsdauer: 90 Minuten

Phagozytoseaktivität von Menschenleukozyten gegenüber
E. coli und Enterokokken bei Anwesenheit von verschiedenen
Konzentrationen der AS



Versuchsdauer: 90 Minuten

Wiederholung der Versuche 19 und 20 mit menschlichen Leuko-
zyten und verschiedenen Konzentrationen der Aristolochiasäure



Versuchsdauer: 90 Minuten

Untersuchungen über die bakterizide Wirkung von
Aristolochiasäure auf *Enteritis coli* O111

	Einsaat Kontroll.	Serien Kontroll.	Serie A	Serie B	Serie C	Serie D
Bakterien	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Phys. NaCl	0,2	0,1	-	-	-	-
Bouillon	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
AS	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
AS in ‰	-	-	1 ‰	0,1 ‰	0,01 ‰	0,001 ‰

Einwirkungs-
dauer der AS

Sofort	ca. 100 000					
1 h	einige 100 000					
2 h	+	+	+	+	+	+
4 h	+	+	+	+	+	+
5 h	+	+	+	+	+	+
10 h	+	+	+			
20 h	+	+	+			
30 h	+	+	+			
40 h	+	+	+			

+ = unendlich viele Keime

Untersuchungen über die bakterizide Wirkung von
Aristolochiasäure auf *Streptokokkus faecalis*

	Einsaat Kontroll.	Serien Kontroll.	Serie A	Serie B	Serie C	Serie D
Bakterien	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Phys. NaCl	0,2	0,1	-	-	-	-
Bouillon	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
AS	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
AS in ‰	-	-	1 ‰	0,1‰	0,01‰	0,001‰

Einwirkungsdauer
der AS

Sofort	ca. 100 000					
1 h	einige 100 000					
2 h	+	+	+	+	+	+
4 h	+	+	+	+	+	+
5 h	+	+	+	+	+	+
10 h	+	+	+			
20 h	+	+	+			
30 h	+	+	+			
40 h	+	+	+			

+ = unendlich viele Keime

IV. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PHAGOZYTÖSESTEIGERUNG DURCH AS IM SERUM VON KINDERN

In Fortführung der vorangehend beschriebenen Versuche sollte geklärt werden, ob nach oraler Verabreichung von handelsüblicher Aristolochiasäure (Tardolyt^R) bei Kindern eine Steigerung der Phagozytosewirksamkeit des Serums nachweisbar wird.

10 Kinder (siehe Tabelle 1) im Alter von 2 bis 8 Jahren erhielten zu den Hauptmahlzeiten AS in einer Dosierung von 3 mal täglich 0,00015. Jeweils vor Therapiebeginn sowie nach 4, 8 und 14 Tagen wurde durch Venenpunktion Blut entnommen, zum Gerinnen in den Brutschrank gebracht, zentrifugiert und das abpipettierte Serum steril bei -17°C eingefroren. Die Kinder erhielten außer AS keine anderen Medikamente.

Diese Seren wurden nach der in Abschnitt II, 8 beschriebenen Versuchsanordnung auf ihre phagozytosesteigernde Wirkung untersucht.

Auf die Verwendung von Menschenleukozyten wurde in diesen Versuchsreihen verzichtet, da in vorangegangenen Versuchen bereits nachgewiesen wurde, daß menschliche und Meerschweinchenleukozyten in Gegenwart von AS gleichartig mit einer Phagozytosesteigerung reagieren.

Bei der statistischen Auswertung wurde das Spannweitenverfahren bei kleinen Stichprobenumfängen ($2 < (n_1; n_2) < 20$) angewendet, wobei der Schwellenwert $K_1 - (n_1; n_2)$ der Tabelle von MOORE (15) entnommen wurde.

1) Anamnestische Angaben

Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Diagnose
1	2	weiblich	Pes equinovarus
2	2 1/2	männlich	Luxatio coxae
3	3	weiblich	Morbus Little
4	3	männlich	Hypothyreose
5	4	männlich	Klippel-Feil-Syndrom
6	4 1/2	weiblich	Franceschetti-Syndrom
7	5	weiblich	Lipoidnephrose
8	6	weiblich	Lipoidnephrose
9	6	männlich	Dystrophia musculorum progressiva (Typ Duchenne)
10	8	weiblich	Lipoidnephrose

Tab. 1: Alter, Geschlecht und Einlieferungsdiagnose der untersuchten Kinder, die außer Aristolochiasäure (Dosierung: 3 mal täglich 0,15 mg) keine weiteren Medikamente erhielten.

2) Ergebnisse

Wie die Abb. 21 erkennen läßt, erreichte die Phagozytose von Enteritis coli 0111 auch nach 90 Minuten Versuchsdauer in Gegenwart von physiologischer Kochsalzlösung sowie dem Serum der Patienten vor Verabreichung der AS nur minimale Grade. Nach 4tägiger Einnahme der AS war eine Erhöhung der mittleren Phagozytosewerte um 1,8 Grad festzustellen. Der annähernd gleiche Wert wurde auch für die Seren ermittelt, die 8 Tage nach Versuchsbeginn entnommen waren. Der mittlere Phagozytosewert nach 4 und 8 Tagen ist bereits bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99,5 % signifikant von dem Phagozytosewert der Serumkontrolle vor Versuchsbeginn verschieden. 14 Tage nach Beginn der AS-Verabreichung betrug der mittlere Phagozytosegrad für Enteritis coli 3,85 und näherte sich damit dem maximalen Phagozytosestandard, der bisher nur in Gegenwart von spezifischen, gegen O-Antigen von Enteritis coli gerichteten Kaninchenimmunserum erreicht wurde.

In der Abb. 22 sind die Versuche mit Enterokokken als Phagozytoseobjekt wiedergegeben. Die Kontrollen mit Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung bzw. mit Normalserum von Kindern vor Verabreichung der AS zeigten

wiederum nur minimale Phagozytosegrade. Im Gegensatz dazu war bereits nach 4tägiger Verabreichung von AS die phagozytosesteigernde Wirkung der Seren so deutlich, daß ein mittlerer Phagozytosegrad von 4,85 erreicht wurde. Auch die nach 3 bzw. 14 Tagen gewonnenen Seren zeigten Phagozytosesteigerungen, die mit 4,8 bzw. 4,45 Grad nahe dem Maximalwert des spezifischen Immunserums lagen.

In Ergänzung zu den Phagozytoseversuchen wurden die hierbei verwendeten Seren immunoelektrophoretisch untersucht. Hierzu wurde das Serum der 10 Patienten vor Versuchsbeginn und nach 14tägiger Verabreichung von AS in Gegenwart von 0,05 Veronalpuffer mit einem pH von 8,2 1 Stunde bei 40 V aufgetrennt und mit Anti-Human-Serum vom Pferd (No. 223, Institut Pasteur) dargestellt.

Die Färbung erfolgte nach dem Verfahren von Ponceau. Dabei konnte bei 2 Patienten eine geringe Vermehrung der Ig-G-Globuline festgestellt werden, während die restlichen 8 Kinder nach 14tägiger Therapie keine Veränderungen in den Eiweißfraktionen erkennen ließen.

Nebenwirkungen oder Unverträglichkeitserscheinungen konnten während der 14tägigen Verabreichung der AS nicht beobachtet werden. Eine in Abständen von 8 Tagen durchgeführte Kontrolle des Blutbildes einschließlich Differenzierung der weißen Blutkörperchen ließ keine Normabweichung erkennen.

TABELLARISCHE ZUSAMMENSTELLUNG
DER ERGEBNISSE

Phagozytose- grad

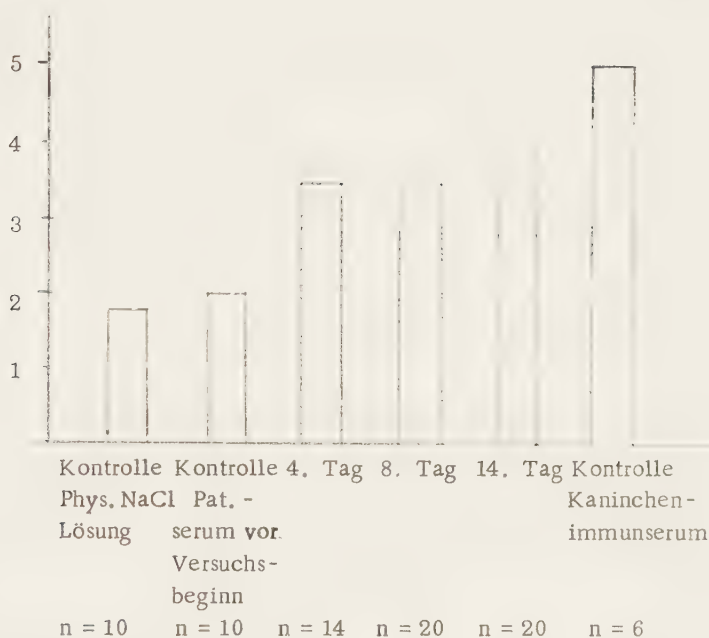


Abb. 1:

Phagozytose von Enteritis-Coli 0111 nach 4, 8 bzw. 14tägiger Verabreichung von Aristolochiasäure. Die angegebenen Phagozytosegrade sind Mittelwerte nach 90 Minuten Versuchsdauer. Die mittleren Phagozytosegrade der Serumkontrolle vor Versuchsbeginn und der Seren nach 4tägiger Verabreichung der AS sind bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99,5 % signifikant voneinander unterschieden.

Phagozytose - grad

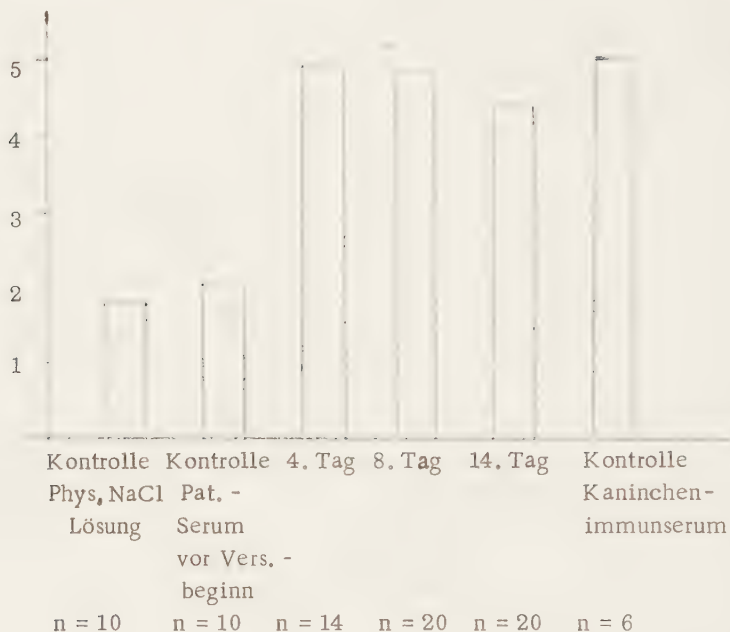


Abb. 2:

Phagozytose von *Streptokokkus faecalis* nach 4, 8 bzw. 14tägiger Verabreichung von Aristolochiasäure. Die angegebenen Phagozytosegrade sind Mittelwerte nach 90 Minuten Versuchsdauer. Die Mittelwerte der Phagozytosegrade der Patientenseren vor Versuchsbeginn sind gegenüber denjenigen nach bereits 4tägiger Verabreichung von AS bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99,9 % signifikant voneinander verschieden.

Die Immunelektrophoresen der Patientenserum

Vom Serum aller Patienten wurde vor Versuchsbeginn und nach 14 tägiger Verabreichung von AS eine Immunelektrophorese hergestellt.

Die technischen Daten der Herstellung waren:

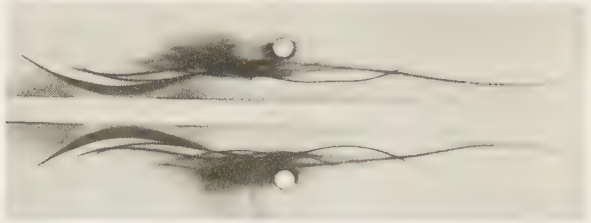
0,05 M Veronalpuffer pH 8,2 · 1 Stunde
40 V. Entwickelt mit Anti-Human-Serum
vom Pferd Nr. 223 (Institut Pasteur)
Färbung: Ponceau

Die einzelnen Immunelektrophoresen:

Patient 1

Ende

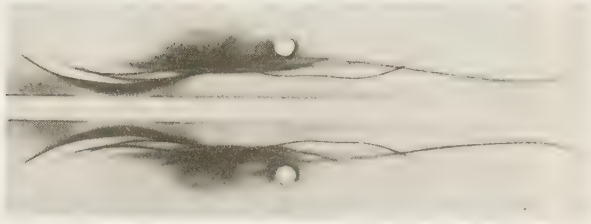
Anfang



Patient 2

Ende

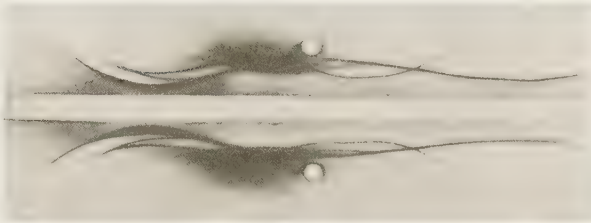
Anfang



Patient 3

Ende

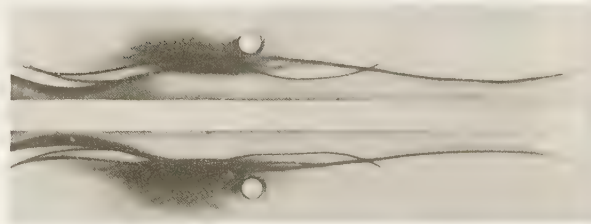
Anfang



Patient 4

Ende

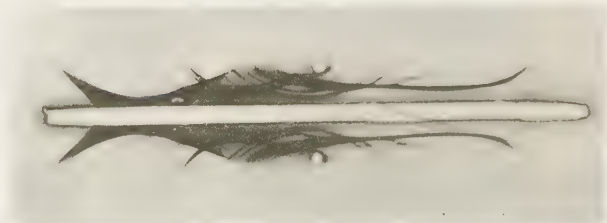
Anfang



Patient 5

Ende

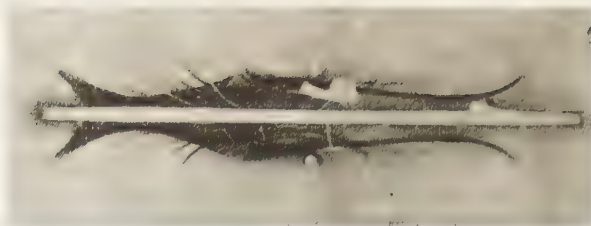
Anfang



Patient 6

Ende

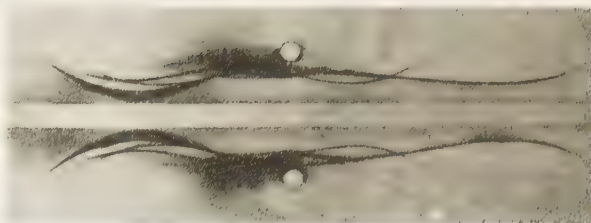
Anfang



Patient 7

Ende

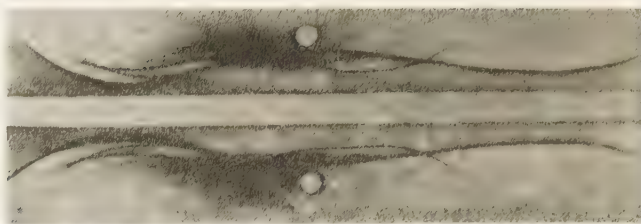
Anfang



Patient 8

Ende

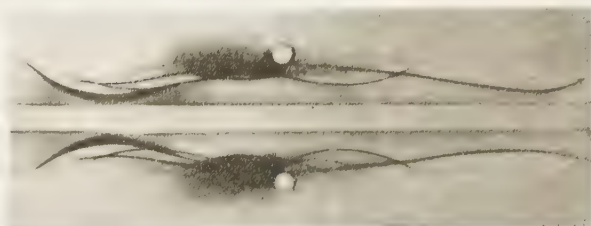
Anfang



Patient 9

Ende

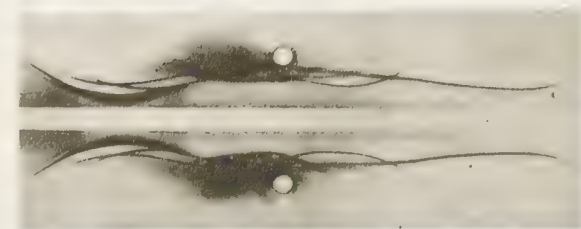
Anfang



Patient 10

Ende

Anfang



V. DISKUSSION

Schon in früheren Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich im in vitro Versuch Meerschweinchenleukozyten durch Immunsorum und bestimmte Antibiotika in ihrer Phagozytoseaktivität anregen lassen (16).

Die von MOSER (3) durchgeführten klinischen Untersuchungen und die von MÖSE (7) tierexperimentell belegten Ergebnisse mit der AS ließen vermuten, daß die AS die Phagozytose anregt.

Wie in den Ergebnissen berichtet, ergab der Zusatz von AS in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ und $2,5 \cdot 10^{-5}$ zum Versuchsansatz eine starke Phagozytosesteigerung. Da die Wirksamkeit der AS bei Konzentrationen von $2,5 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-7}$ und $2,5 \cdot 10^{-8}$ deutlich nachließ, muß angenommen werden, daß die Leukozyten in diesen Konzentrationen nicht mehr stimuliert werden.

Die optimale phagozytosesteigernde Wirkung der AS lag in allen Versuchsansätzen bei einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ bis $2,5 \cdot 10^{-4}$. Bei höheren wie auch niedrigeren Konzentrationen war die Wirksamkeit geringer. Inwieweit hieraus ein Dosierungshinweis für die klinische Therapie abgeleitet werden kann, läßt sich anhand dieser orientierenden Versuche nur mit großer Vorsicht erwägen.

Die Inkubationsversuche mit Meerschweinchenleukozyten in 0,1 %iger AS zeigten, daß der Angriffspunkt der Phagozytosesteigernden Wirkung der AS an den Leukozyten zu suchen ist. Die gesteigerte Phagozytose der inkubierten Leukozyten war sowohl von der Konzentration der AS wie auch von einer optimalen Dauer der Inkubation abhängig.

Diejenigen Leukozytosen, die in 0,1 %iger AS 15 Minuten lang inkubiert waren, erbrachten im Versuch eine Steigerung der Phagozytoseaktivität um 4 Grade gegenüber den Kontrollversuchen mit nicht inkubierten Leukozyten. Eine Inkubationsdauer von weniger als 10 Minuten oder mehr als 20 Minuten führte zu keiner Phagozytosesteigerung. Das Aufschwimmen der Leukozyten in 0,01 %iger AS führte selbst bei einer Inkubationsdauer von 30 Minuten zu keiner Phagozytosesteigerung. Da aus den wieder gegebenen Versuchen bekannt ist, daß die AS in 0,01 %iger Lösung nur eine schwache Anhebung der Phagozytose im Versuchssystem bewirkt, ist daraus zu schließen, daß auch durch längere Einwirkung eine unterschwellige Konzentration nicht phagozytosewirksam wird. Ferner dürfte der Zeitfaktor auch insofern eine entscheidende Rolle spielen, als der Aufenthalt der

Leukozyten in einem unphysiologischen Milieu eine zunehmende Verminderung der Phagozytoseaktivität bewirkt.

Eine Inkubation der Bakterien in AS von verschiedenen Konzentrationen erbrachte weder einen fördernden noch hemmenden Einfluß auf deren Wachstum. Damit ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von MÖSE (7) nachgewiesen, daß AS keine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung besitzt. Auch lassen die Bakteridizieversuche in Ergänzung der vorangegangenen Untersuchungen mit inkubierten Bakterien erkennen, daß die gesteigerte Phagozytose von *E. coli* und Enterokokken nicht auf eine Vorschädigung oder andersweitige Veränderung der Bakterien zurückzuführen ist. Wie in den Abb. 7 und 8 wiedergegeben ist, werden *E. coli* und Enterokokken in Gegenwart von Meerschweinchen Serum (Komplement) gleich stark phagozytiert. Dabei war zwischen unbehandelten lebenden Keimen und solchen, die 45 Minuten in 0,1 %iger AS-Lösung inkubiert worden waren, kein Unterschied im Phagozytosegrad nachweisbar. Durch diese Befunde wird deutlich, daß die unmittelbare Stimulierung der Leukozyten durch die AS als einzige Ursache der Phagozytosesteigerung anzusehen ist.

Besonderes Interesse hatte daher die Frage, ob in Anwesenheit von menschlichem Serum oder von Gamma-Globulin eine Modifikation der phagozytosesteigernden Wirkung der AS festzustellen ist.

Die Abb. 15 und 16 zeigen, daß die phagozytosefördernde Wirkung der AS auch in Anwesenheit der Gamma-Globuline unverändert stark ist. Zum gleichen Ergebnis führen die Untersuchungen mit menschlichem Serum und AS (Abb. 9 und 10). Ein additives Verhalten der AS und der verwendeten Seren bzw. Gamma-Globuline kann dadurch als ausgeschlossen gelten, daß die nur geringe phagozytosesteigernde AS-Verdünnung von $2,5 \cdot 10^{-6}$ sowohl in Anwesenheit von Gamma-Globulin als auch von Serum keine Wirkungssteigerung erkennen ließ (Abb. 15 und 16).

Die in der Literatur wiedergegebenen Beobachtungen über die Phagozytosesteigerung durch AS wurden, soweit experimentelle Untersuchungen vorliegen, vorwiegend im Tierversuch gewonnen (7). In Ergänzung dazu lassen die in den Abb. 17, 18, 19 und 20 aufgeführten Versuche mit menschlichen Leukozyten erkennen, daß diese in gleich starker Weise wie Meerschweinchenleukozyten zur Phagozytose von *Enteritis coli* und Enterokokken angeregt werden.

Menschliche Leukozyten verhalten sich demnach sehr ähnlich gegenüber AS wie Meerschweinchenleukozyten. Auf diese Reaktionsverwandtschaft wurde anhand von Phagozytoseversuchen in Gegenwart von Kaninchenimmunsrum und Antibiotika von STEHR (14) bereits früher hingewiesen.

Es erschien daher angezeigt, unter Verwendung oben genannter Versuchsanordnung, die Wirkung der AS im Serum von pädiatrischen Patienten zu untersuchen, nachdem ihnen AS in der therapeutisch empfohlenen Dosierung verabreicht worden war.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß die AS nach einer Verabreichungsdauer von einigen Tagen durch gesteigerte Phagozytose im in vitro-Versuch nachweisbar wird. Darüberhinaus wurde deutlich, daß manche am 4. Tag nach der Einnahme der AS gewonnenen Patientenserum noch keine oder nur geringe phagozytosesteigernde Wirkung gegenüber E. Coli besitzen, während nach 14 Tagen in 13 von 20 Versuchsansätzen nach 90 Minuten Versuchsdauer ein starker bis sehr starker Phagozytosegrad erreicht wird. Es kann nicht entschieden werden, ob es sich hierbei um eine langsam eintretende und vielleicht auch individuell unterschiedliche Kumulation des Medikaments im Organismus handelt, da über die biologische Halbwertszeit der Substanz im kindlichen Organismus bislang nichts bekannt ist.

Die Versuche lassen weiterhin nicht erkennen, ob durch eine länger als 14 Tage dauernde Verabreichung von AS die Phagozytoseaktivität gegenüber E. coli noch gesteigert werden kann. Es läßt sich jedoch innerhalb der genannten Verabreichungsdauer eine konstante Zunahme der Phagozytoseaktivität des Patientensera beobachten.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit E. coli wird die Phagozytose von Enterokokken bereits nach 4tägiger Verabreichung der AS durch die gleichen Seren stark angeregt. Das läßt vermuten, daß der für die Phagozytoseanregung notwendige Wirkspiegel gegenüber verschiedenen Bakterienarten unterschiedlich ist.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß bei Infektionen mit E. coli ein Zeitraum von 14 Tagen als untere Grenze für die Verabreichungsdauer und zum Erzielen eines ausreichenden Wirkspiegels anzunehmen ist.

Die Verhältnisse bei Enterokokken scheinen demgegenüber nach eigenen Beobachtungen günstiger zu liegen. Für eine zeitliche Begrenzung der Behandlungsdauer geben diese Versuche keinen Anhalt. Auch in der Literatur fand sich kein entsprechender Hinweis. Da die Substanz bislang so geringe Toxizität zeigte, dürfte auch eine längere Verabreichung ohne toxische Nebenwirkungen sein, was die klinischen Versuche bestätigten. Es muß jedoch nochmals darauf hingewiesen werden, daß Blutspiegeluntersuchungen aus wahrscheinlich vorwiegend methodischen Gründen wegen der geringen Dosis und des damit zu erwartenden Serumspiegels nicht vorliegen. Die Empfindlichkeit bislang vorhandener chemischer Nachweismethoden (Patt) reicht dazu nicht aus. Umso mehr muß darauf hingewiesen werden, daß es mit der

angeführten Methode gelungen ist, einen qualitativen Nachweis der Wirksamkeit der AS beim Menschen im in vitro-Versuch zu führen.

Es besteht kein Unterschied zwischen der Phagozytose in Gegenwart von Immunseren und den erreichten Phagozytosegraden gegenüber Enterokokken nach 4, 8 und 14tägiger Medikation von AS. Die vier genannten Werte sind von der 0,9 %igen Kochsalzkontrolle bzw. der Kontrolle mit Patientenserum vor Verabreichung der AS bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99,9 % signifikant voneinander verschieden.

Ein so hoher Phagozytosegrad, wie ihn die in den Versuchsansätzen verwendete AS erreicht, konnte bislang nur bei Verwendung von O-Antigen-haltigem Kaninchenimmunserum nachgewiesen werden. Es handelt sich demnach um eine biologisch hochaktive Substanz, die schon in sehr niedriger Dosierung therapeutisch wirksam wird.

Die Verabreichung von AS brachte während der Behandlungsdauer keine Immunelektrophoretisch nachweisbare Veränderung im Immunglobulinsystem. Die beobachtete Phagozytosesteigerung ist deshalb in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Versuchen auf eine direkte Beeinflussung der Leukozyten durch die im Serum enthaltene AS zurückzuführen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Aristolochiasäure auf die Phagozytosefunktion von Meerschweinchenleukozyten und menschlichen Leukozyten gegenüber Enteritis-coli des Typs O111 und Enterokokken (*Streptokokkus faecalis*) untersucht.

Die Zugabe von AS in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ ergab in allen Versuchen eine maximale Phagozytosesteigerung, die ebenso hoch war wie die in Gegenwart von Kaninchenimmunserum.

Die Inkubation von Meerschweinchenleukozyten in 0,1 %iger AS bewirkte ebenfalls eine deutliche Steigerung der Phagozytose. Eine Inkubationsdauer von 10 bis 20 Minuten erwies sich als optimal fördernd, während sich kürzere oder längere Inkubation als weitgehend unwirksam erwiesen. Längere Inkubation in der schwach wirksamen AS Konzentration von 0,01 % konnte die Leukozyten nicht in ihrer Wirkung steigern.

Durch Versuche mit inkubierten Bakterien konnte eine Veränderung der Bakterien im Sinne einer Bakteriostase, Bakterizidie oder irgendeiner anderen phagozytosefreundlichen Veränderung ausgeschlossen werden.

Die Zugabe der AS zu Menschenserum und auch zu handelsüblichem Gamma-Globulin führte regelmäßig zu einer Phagozytosesteigerung von hohen Graden.

Bei einer Versuchsreihe, in der menschliche Leukozyten verwendet wurden, konnte durch Zugabe von AS die Phagozytoseaktivität der Leukozyten ebenfalls angehoben werden.

Nach 4, 8 und 14tägiger Verabreichung der AS als Natriumsalz an 10 Kinder im Alter von 2 bis 8 Jahren in einer Dosierung von 3 mal täglich 0,15 mg ließ sich im in vitro-Versuch eine phagozytosesteigernde Wirkung der Seren auf Meerschweinchenleukozyten feststellen. Die Phagozytose von Enterokokken wurde von denselben Seren stärker angeregt, als die von Enteritis coli. Nach einer Verabreichungsdauer von 14 Tagen wurden beide Bakterienstämme fast ebenso stark in Gegenwart der Patientenserum phagozytiert wie unter dem Einfluß von Kaninchenimmunserum mit bekannter optimaler phagozytosesteigernder Wirkung. Die Immunglobuline der Patientenserum wurden in diesem Zeitraum durch die AS nicht nachweisbar verändert. Nebenwirkungen oder eine Beeinflussung der roten bzw. der weißen Blutbilder wurden ebenfalls nicht beobachtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. K. STEHR möchte ich für die Überlassung des Themas, für seinen hilfreichen Rat und für die Übernahme des Referates herzlich danken. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. H. SPIESS für die Arbeitsmöglichkeit in der Pädiatrischen Abteilung der Poliklinik.

SCHRIFTTUM

1. ORZECOWSKI, G. :
Gezielte Beeinflussung der Entzündungsabwehr
Med. Mschr. 17, 572-577 (1963)
2. SCHMID, F. :
Phagozytose
Fortschr. Med. 85, 1035-1038 (1967)
3. MOSER, H. :
Klinische Erfahrung mit der Aristolochiasäure bei bisher therapie-
resistenten langdauernden Eiterungen
Langenbecks Archiv u. Dtsch. Zt. f. Chirurgie 304, 660-663 (1963)
4. MADAUS, G. :
Biologische Heilmittel Band I
579 - 580 (1938)
5. HILDEGARD VON BINGEN
Ursache und Behandlung der Krankheiten
278 (1955)
6. PARACELUSUS
Sämtliche Werke, Band I 530, Band III 412
7. MÖSE, J.R. :
Arzneimittelforschung 11, 33 (1961)
8. MÖSE, J.R. :
Planta medica 11, 72-91 (1963)
9. ORZECOWSKI, G. :
Die Bedeutung der parenteralen Verdauung und der phagozytierenden
Blutzellen für die Abheilung von Entzündung und Verletzung
Med. u. Ernährung 5, 247-252 (1964)
10. BAETGEN, D. :
Behandlung der rezidivierenden Angina im Kindesalter
Med. Mschr. 20, 474-476 (1966)
11. JUMMEL, F. :
Über die Wirksamkeit der Aristolochiasäure bei chronisch entzündlichen
Prozessen
Therapie der Gegenwart 103, 1020 - 1022 (1964)

12. ORZECZOWSKI, G. :
Eine alte Droge im neuen Gewand
Zschr. f. Therapie 4, 229 - 232 (1964)
13. STEHR, K. :
Über therapieresistente Enterobakterien
Arch. Kinderhkl. Beih. 49, 61 ff (1963)
14. STEHR, K. :
Beiträge zur Biologie der Salmonella paratyphi B
I. Mitt. Zbl. Bakt. I Orig. 173, 216-230 (1958)
15. MOORE, P.G. :
Table of significance points for a two-sample t-test on range
Biometrika 44, 482 (1957)
16. STEHR, K. :
Beeinflussung der Phagozytoseaktivität von Leukozyten
Vortrag 4. Jahrestg. Österr. Ges. f. Kinderhkl.
Wien 1966
17. v. PHILIPSBORN, E. :
Über die Steigerung der Abwehrkräfte der Leukozyten
Fortschr. Med. 85, 1051-1053 (1967)
18. DECHAMPS, P.D. :
Der Einfluß von Human-Gammaglobulin auf die Phagozytoseaktivität
von Meerschweinchenleukozyten
Inaug. Diss. München 46-47 (1967)

LEBENS LAUF

Am 17. Mai 1940 wurde ich als Sohn des Forstmeisters Karl Wahle und seiner Frau Elisabeth, geb. Gutknecht, in Tiengen/Oberrhein geboren. Nachdem mein Vater 1942 in Rußland gefallen war, verzogen wir nach Triberg i. Schwarzwald, wo ich die Volksschule besuchte. Nach der Wiederverheiratung meiner Mutter mit dem in Hausach i.K. tätigen Oberstudienrat Hans Winter zogen wir nach Hausach i.K. Dort besuchte ich das Gymnasium bis zur Mittleren Reife.

1957 begann ich eine Lehre als Werkzeugmacher bei der Fa. Schiele Industriewerke Hornberg, die ich nach 3 Jahren mit der Facharbeiterprüfung abschloß.

Im Jahre 1957 ist meine Mutter verstorben. Nach privater Vorbereitung zur Oberprima wurde ich 1961 in die 9. Klasse des Realgymnasiums in Starnberg aufgenommen, wo ich 1962 das Abitur ablegte. Von 1962 bis 1963 studierte ich an der Universität Erlangen. Nach dem Vorphysikum wechselte ich nach Heideiberg, wo ich das Physikum im Frühjahr 1965 ablegte.

Im 7. Semester setzte ich mein Studium an der Universität München fort. Am 21. 6. 1968 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen.

1. The first section of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work during the year. It mentions the various committees and the work they have done, and also the progress of the various departments of the government.

2. The second section deals with the financial situation of the country. It mentions the various sources of revenue and the expenditure of the government, and also the progress of the various departments of the government.

3. The third section deals with the administrative situation of the country. It mentions the various departments of the government and the progress of the work during the year.

4. The fourth section deals with the judicial situation of the country. It mentions the various courts and the progress of the work during the year.

5. The fifth section deals with the educational situation of the country. It mentions the various schools and the progress of the work during the year.

6. The sixth section deals with the health situation of the country. It mentions the various hospitals and the progress of the work during the year.

7. The seventh section deals with the social situation of the country. It mentions the various social organizations and the progress of the work during the year.

8. The eighth section deals with the foreign relations of the country. It mentions the various foreign countries and the progress of the work during the year.

9. The ninth section deals with the internal security of the country. It mentions the various security organizations and the progress of the work during the year.

10. The tenth section deals with the general progress of the country. It mentions the various achievements of the government and the progress of the work during the year.

